製品コード 9054

TaKaRa

E.coli BMH 71-18 *mutS* Competent Cells

説明書

v201109Da

I. 内容

E.coli BMH 71-18 *mutS* Competent Cells	100 μl × 10 本
pUC119 plasmid（0.1 ng / μl）	10 μl × 1 本
SOC 培地＊	1 ml × 10 本

＊：SOC 培地の組成		
	2%	Tryptone
	0.5%	Yeast extract
	10 mM	NaCl
	2.5 mM	KCl
	10 mM	$MgSO_4$
	10 mM	$MgCl_2$
	20 mM	Glucose

II. 特性および用途

コンピテントセルは、外来 DNA を取り込む能力を持つ受容菌で、遺伝子組換え体プラスミドなどを取り込みます。形質転換の際には、効率良く確実に外来 DNA を導入できるコンピテントセルが必要となります。TaKaRa では、Hanahan の方法に改良を加え、このコンピテントセルを調製しました。

E.coli BMH 71-18 *mutS* Competent Cells は、*mutS* 株で、DNA のミスマッチの修復能力が欠損している宿主菌です。Site-directed mutagenesis を行う際に、このコンピテントセルで形質転換、形質導入を行うと、DNA のミスマッチしている部分の修復をおさえながらミュータント DNA の増幅が行えます。

III. 使用方法

[1] プラスミドベクターを形質転換する場合

（1） *E.coli* BMH 71-18 *mutS* Competent Cells を使用直前に、氷中で融解する。
（2） 融解したら、穏やかに混和し均一にし、100 μl のコンピテントセルを 14 ml 丸底チューブ（ファルコン・ラウンドチューブ等）に移す（ボルテックスは用いない）。
（3） 形質転換する DNA を入れる（10 ng 以下が望ましい）。
（4） 氷中、30 分間放置する。
（5） 42℃で 45 秒間インキュベートする。
（6） 氷中 1 ～ 2 分間放置する。
（7） あらかじめ 37℃に保温しておいた SOC 培地を最終 1 ml になるように加える。
（8） 37℃で 1 時間振とうする（160 ～ 225 rpm）。
（9） プレートに適当量まく。＊
（10）37℃で一晩培養する。

＊： プレートにまく液量は、直径 9 cm のプレートの場合 100 μl 以下にしてください。

[2] M13 ファージベクター DNA を形質導入する場合

（1） プラスミドベクターを形質転換する場合の（1）から（8）までの操作を行う。
（2） 3 ml の YT-soft agar（46 ～ 48℃に保温）に、200 μl の宿主菌（*E.coli* BMH 71-18 *mutS* A_{600} = 0.8 ～ 1.0）を加える。
（3） （1）の適当量を（2）の agar に混和し、すばやく YT- プレート上に広げる。
（4） プレートを室温で 10 ～ 15 分置いた後、37℃で一晩インキュベートする。

使用上の注意

1. コンピテントセルは必要な本数だけを取り出し、運搬時は、ドライアイス／エタノールに入れてください。
2. 14 ml 丸底チューブ（BD 社 Code 352059 または 352057 等）の他、1.5 ml マイクロ遠心チューブを用いても形質転換は可能ですが、効率が若干悪くなることがあります。
3. 100 μl のコンピテントセルを用いる場合、形質転換する DNA の量を、高純度なもので 10 ng 以下にしないと、効率は悪くなります。
4. スケール（コンピテントセルの量など）を変えたり、他のチューブを用いたりする場合には、最適の条件を検討する必要があります。（例えば、マイクロチューブを用いるときは、42℃で 60 秒間インキュベートしてください。）
5. 回復培養は SOC 培地の他、L-broth や ψb-broth でも構いませんが、若干効率が悪くなることがあります。
   - ・L-broth：　10 g Bacto tryptone, 5 g Bacto yeast extract, 5 g NaCl / 1 L water, 1 N KOH で pH7.5 前後に調製し、オートクレーブする。
   - ・ψ b-broth：　5 g Bacto yeast extract, 20 g Bacto tryptone, 5 g $MgSO_4$・$7H_2O$ / 1 L water, 1 N KOH で pH7.5 前後に調製し、オートクレーブする。
6. 希釈が必要なときは、[1] の（7）で加えた培地で行ってください。
7. YT- プレート：8 g Bacto tryptone, 5 g Bacto yeast extract, 5 g NaCl / 1 L water, 1 N NaOH で pH7.5 前後に調製し、1.5% になるよう agar を添加しオートクレーブする。
8. YT-soft agar：　0.8 g Bacto tryptone, 0.5 g Bacto yeast extract, 0.5 g NaCl / 100 ml water, 1 N NaOH で pH7.6 前後に調製し、0.6% になるよう agar を添加しオートクレーブする。
9. 宿主菌は、コンピテントセルから培養することができます。
10. Site-directed mutagenesis Mutan-K, Mutan-Express Km をご使用になる場合は、それぞれの取扱説明書にしたがってください。
11. 一度融解したコンピテントセルを再度凍結保存することはお勧めしません。やむを得ず行う場合は、ドライアイス / エタノール中で凍結させ、－ 80℃で保存してください。ただし、形質転換効率は 1 オーダー以上低下する可能性があります。

IV.　形質転換効率

プラスミドベクターで形質転換する場合の方法により 1 ng の pUC119 プラスミドで形質転換し、Amp^+ のプレートでコロニーを選別しました。
このとき、＞ 1 × 10^7 colonies / μg pUC119 プラスミドの効率を得ました。

V.　Genotype

E. coli BMH 71-18 *mutS*：△ (*lac-proAB*), *supE*, *thi*-1, *mutS*215::Tn10 (tet^r)/ F' [*traD*36, *proAB*$^+$, *lac I*^{q}, *lacZ* △ M15]

VI.　Cell density

1 ～ 2 × 10^9 bacteria / ml

VII. 保存

－ 80℃
注意：保存は－ 80℃以下で行ってください。温度管理が不十分な場合、形質転換効率が低下することがあります。そのような事態が予想される場合は、付属の pUC119 を用いて形質転換効率を確認の上、使用してください。
液体窒素では保存しないでください。

VIII. 参考文献

1）Hanahan,D. (1983) *J.Mol.Biol*., **166**, 577.
2）Kunkel, T.A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., **82**,488.
3）Kunkel, T.A. *et al*. (1987) *Methods in Enzymology*, **154**, 367
4）Zoller, M.J. and Smith, M. (1983) *Methods in Enzymology*, **100**, 468.
5）広瀬　進（1986）続生化学実験講座 vol.1, 遺伝子研究法 II , 105.
6）Hashimoto - Gotoh, T.,*et al* (1995) *Gene*, **152**, 271 - 275

IX. 関連製品

pUC119 DNA（製品コード 3319）

X. 注意

・本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
・本説明書に記載されている商品名などは、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。ライセンスなどに関する最新の情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

201109Da